

**(54) QUANTITATIVE ANALYSIS METHOD AND APPARATUS FOR ANION**

(11) 60-67856 (A)

(43) 18.4.1985 (19) JP

(21) Appl. No. 58-175874

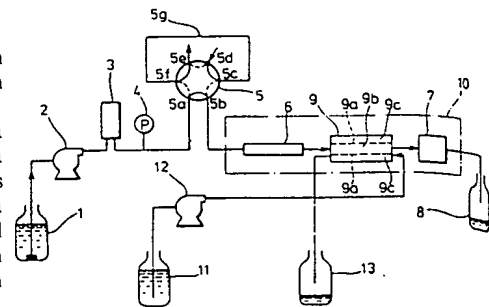
(22) 22.9.1983

(71) YOKOKAWA HOKUSHIN DENKI K.K. (72) YUZURU HANAOKA(2)

(51) Int. Cl. G01N30/96, B01D15/08

**PURPOSE:** To enable the use of a suppressor by employing a potassium hydrogen phthalate solution as eluent for an anion quantitative analyzer having a column filled with a silica-based anion exchanger.

**CONSTITUTION:** An eluent comprising a potassium hydrogen phthalate reaches a sampling valve 5 through a tank 1, a liquid feed pump 2, a damper 3 and a manometer 4. When a sample is put into a weighing tube 5g and the valve 5 is changed over as shown by the dotted line, the sample is fed to a column 6, a suppressor 9, a detector 7 and a waste liquid tank 8 with the eluent. The liquid removed is fed the suppressor 9 with a pump 12. The sample reaches the column 6 and ion contained is separated. The ion separated is replaced with other ion by the suppressor 9 and then, detected with the detector 7.

**(54) IMMOBILIZED MATTER SUCH AS ACTIVE PROTEIN AND MEASUREMENT OF ANTIGEN AND ANTIBODY USING SAME**

(11) 60-67857 (A)

(43) 18.4.1985 (19) JP

(21) Appl. No. 58-176356

(22) 26.9.1983

(71) FUJI REBIO K.K. (72) YASUSHI KASAHARA(2)

(51) Int. Cl. G01N33/545, A61K39/385, A61K39/44, C12N11/02, C12Q1/00

**PURPOSE:** To enable the measurement of an antigen or an antibody handily and with a high sensitivity by a method wherein a substance having an antigen or an antibody and an enzyme, or an enzyme blocking or activating substance immobilized thereon separated from each other is made to react upon an antigen or an antibody and then, the activity of the enzyme or the enzyme blocking or activating substance is measured after the reaction thereof with the enzyme or the enzyme blocking or activating substance.

**CONSTITUTION:** An immobilized substance has a solid phase of an antigen or an antibody and the solid phase of an enzyme or enzyme blocking or activating substance separate from each other. The antigen or the antibody to be measured is made to coexist with a bond of the antibody or the antigen to react with the immobilized antigen or antibody and the enzyme blocking or activating substance or an enzyme to react with the immobilized enzyme or enzyme blocking or activating substance to cause a competition between the reaction of the antigen and antibody and the reaction of the enzyme and the enzyme blocking or activating substance. Then, the activity of the enzyme or enzyme blocking or activating substance is measured to determine the antigen or the antibody.

**(54) DIAGNOSING/EXAMINATION AGENT**

(11) 60-67860 (A)

(43) 18.4.1985 (19) JP

(21) Appl. No. 58-176774

(22) 24.9.1983

(71) MITSUBISHI KASEI KOGYO K.K. (72) KAZUHIRO NAGAIKE(2)

(51) Int. Cl. G01N33/577, A61K39/395, C12Q1/04

**PURPOSE:** To enable the diagnosing and examination of cancer cells by using a monoclonal antibody for recognizing  $\alpha$ -fetoprotein existing on the surface of a cell membrane.

**CONSTITUTION:** A monoclonal antibody for recognizing  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) as marker of cancer existing on the membrane surface of a cancer cell used to be a diagnosing/inspecting agent for cancers. To obtain the monoclonal antibody, human AFP is immunized to a mouse. Thereafter, the spleen is extracted and fused with mouse's myeloma cell using polyethylene glycol to obtain a hybridoma. Then, a monoclonal antibody is obtained from the supernate. The antibodies thus obtained are used to dye a liver cancer cell line and an antibody indicating a positive value is selected. The massproduction of monoclonal antibodies can be done by cultivating a large amount of hybridoma in a cultivation tank.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑬ 公開特許公報(A)

昭60-67857

⑫ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和60年(1985)4月18日

G 01 N 33/545  
A 61 K 39/385  
39/44  
C 12 N 11/02  
C 12 Q 1/00

7906-2G  
7043-4C  
7043-4C  
7421-4B  
8213-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

⑭ 発明の名称 活性蛋白等固定化物及びそれを用いた抗原、抗体の測定方法

⑮ 特 願 昭58-176356

⑯ 出 願 昭58(1983)9月26日

⑰ 発 明 者 笠 原 靖 東京都新宿区下落合4丁目6番7号 富士レジオ株式会社  
内

⑱ 発 明 者 鈴 木 博 正 東京都新宿区下落合4丁目6番7号 富士レジオ株式会社  
内

⑲ 発 明 者 芦 原 義 弘 東京都新宿区下落合4丁目6番7号 富士レジオ株式会社  
内

⑳ 出 願 人 富士レジオ株式会社 東京都新宿区下落合4丁目6番7号

㉑ 代 理 人 弁理士 田中 政浩

明 細 書

1 発明の名称

活性蛋白等固定化物及びそれを用いた抗原、  
抗体の測定方法

2 特許請求の範囲

1 抗原又は抗体と、酵素又は酵素阻害もしくは  
は活性化物質とが、担体に各々の固定相が分離さ  
れて固定されている、抗原又は抗体と酵素又は酵  
素阻害もしくはは活性化物質の固定化物

2 下記の方法よりなる抗原又は抗体の測定方  
法

(1) 測定対象たる抗原と反応する抗体又はこの  
抗体と反応する抗原と、酵素又は酵素阻害もしくは  
は活性化物質とを担体に各々の固定相を分離して  
固定した固定化物と、該固定化物に固定された抗  
体又は抗原と反応する抗原又は抗体と該固定化物  
に固定された酵素又は酵素阻害もしくはは活性化  
物質と反応する酵素阻害もしくはは活性化物質又は酵  
素とを結合した結合物と、測定対象たる抗原とを  
水溶液中で共存せしめ、その後該固定化物又は水

溶液中の酵素活性又は酵素阻害もしくはは活性化物質  
の活性を測定することを特徴とする抗原の測定方  
法

(2) 測定対象たる抗体と反応する抗原又はこの  
抗原と反応する抗体と、酵素又は酵素阻害もしくは  
は活性化物質とを担体に各々の固定相を分離して  
固定した固定化物と、該固定化物に固定された抗  
原又は抗体と反応する抗体又は抗原と該固定化物  
に固定された酵素又は酵素阻害もしくはは活性化  
物質と反応する酵素阻害もしくはは活性化物質又は酵  
素とを結合した結合物と、測定対象たる抗体とを  
水溶液中で共存せしめ、その後該固定化物又は水  
溶液の酵素活性又は酵素阻害もしくはは活性化物質  
の活性を測定することを特徴とする抗体の測定方  
法

3 発明の詳細な説明

本発明は抗原又は抗体と酵素又は酵素阻害もし  
しくは活性化物質とを場を分離して固定した固定化  
物と、それを用いて抗原及び抗体を酵素免疫法に  
よって測定する方法に関するものである。

抗原及び抗体の測定方法には種々の方法が知られているが、酵素免疫法が特異性及び鋭敏性にすぐれ、かつ操作及び装置が比較的簡便であるところから多用されている。そして、この酵素免疫法における操作性をより簡便にしあるいは鋭敏性を高めるための改良研究が種々行なわれている。

本発明者らもこの酵素免疫法を改良すべく種々検討の結果、抗原又は抗体と酵素又は酵素阻害もしくは活性化物質を場を分離して固定した固定化物、及びこの固定化物を用いて抗原と抗体の反応と酵素と酵素阻害もしくは活性化物質との反応を競争させる全く新規な方法を案出し、この方法を用いれば抗原及び抗体を簡便にかつ鋭敏性高く測定しうることを見出して、これに基づいて本発明を完成するに至った。

以下、本発明の内容を詳細に説明する。

まず、本発明の固定化物は、抗原又は抗体と、酵素又は酵素阻害もしくは活性化物質とが担体に各々の固定相が分離されて固定されているものである。

ラガノイド、エステラーゼとベスタチンなどを例として挙げることができる。

本発明の固定化物は抗原又は抗体と酵素又は酵素阻害もしくは活性化物質とが固定されているのであるから、抗原と酵素、抗原と酵素阻害もしくは活性化物質、抗体と酵素、及び抗体と酵素阻害もしくは活性化物質の4種の組合せがあることになる。

このような固定化物は抗原又は抗体の固定相と酵素又は酵素阻害もしくは活性化物質の固定相とが分離されているところに特徴がある。この相分離とは、後述する抗原又は抗体と酵素又は酵素阻害もしくは活性化物質との結合物が一方の相において反応して結合した場合にもう一方の相と更に反応しない程度に両相が互いに分離されていることをいう。但し、両相の境界域において両相と反応する結合物があってもその比率が固定化物の用途との関係において問題にならない程度であればよいことはいうまでもない。

具体的には、担体に用いた重合体の場を分けて

抗原及び抗体の種類は限定されるものではなく、使用目的に応じて適宜選択すればよい。抗原にはハプテン及び2抗体法で用いる場合の第1抗体も含まれ、抗体には $F(ab)_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ のようなフラグメント及び第1抗体に対する第2抗体も含まれる。また、本発明を2抗体法を用いて実施する場合、全ての抗原、第1抗体、第2抗体の組合せも本発明の抗原及び抗体に含まれる。

抗原及び抗体の例としては、各種内分泌腺に由来するホルモン、血清中の免疫グロブリン、アルブミン、フェリチンなどの蛋白質、各種免疫複合体、HB抗原等の病原体、補体、ソゴキシンのような薬物、サイクリックヌクレオチド類、 $\alpha$ -フェトプロテイン、癌胎児性抗原等の各種臓器あるいは血中、尿中に存在する抗原及び抗体を挙げることができる。

酵素と酵素阻害もしくは活性化物質はお互いに反応し合うものである。これらの種類も特に限定されるものではなく、 $\alpha$ -アミラーゼとアミラーゼインヒビター、 $\beta$ -ガラクトシダーゼとイソフ

抗原等と酵素等を固定したものとか抗原等を固定した重合体と酵素等を固定した重合体を貼合せたものなどを例として挙げることができる。また、担体がある程度大きな粒子、例えば直径3 $\mu$ m以上の粒子であるような場合には全体の面積に対して接触面積が問題にならなくなるので、抗原等と酵素等をこのような大きさの別々の粒子に固定したものであってもよい。他の例としては、一方を管に固定し、もう一方を粒子に固定したような場合を挙げることができる。

固定化物の製法としては、重合体の場を分けて固定したものの場合には、例えば官能基を異にしたブロック共重合体とかグラフト共重合体を形成して官能基の差異を利用して抗原等と酵素等を別々に固定すればよい。官能基は、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CHO$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ など通常のものでよい。これらの重合体を構成成分とするブロック共重合体、グラフト共重合体は公知の方法によって製造すればよい。一方、固定されるものが酵素阻害物質などで、固定してから共重合体を形成しても活性が

失なわれないような場合には、そうすることによって官能基が異ならなくともよい場合がある。

重合体を貼合わせる場合には予め貼合わせてから固定化してもよく、その逆でもよい。貼合せは融着であってもよく接着であってもよい。

このような担体の外形は特に限定されるものではなく、例えば、球形、円盤形、長方形、円管形などをよい。

抗原、抗体、酵素、及び酵素阻害もしくは活性化物質の固定化方法は公知の方法に準じて行なえばよい。抗体、酵素、及び抗原、酵素阻害もしくは活性化物質のうち蛋白質のものについては、シアノ法、ペプチド結合法、アルキル化法等の共有結合法、イオン結合法、物理的吸着法などの酵素等の活性蛋白を担体に固定する公知の方法に準じて行なえばよく、蛋白質以外のものも抗原等と担体等の官能基等を考慮して固定化方法を適宜選択すればよい。この固定化されている抗原には、例えば担体に共有結合されている抗原に第1抗体を抗原抗体反応させ、これにさらに第2抗体を反応

させるような場合の抗原と第1抗体との反応物も含む。

この固定化物を用いて抗原を測定する場合には、固定相の一方には測定対象たる抗原と反応する抗体又はこの抗体と反応する抗原を固定し、抗体を測定する場合には、固定相の一方に測定対象たる抗体と反応する抗原又はこの抗原と反応する抗体を固定する。

そして、該固定化物に固定された抗原又は抗体と反応する抗体又は抗原と該固定化物に固定された酵素又は酵素阻害もしくは活性化物質と反応する酵素阻害もしくは活性化物質又は酵素とを結合した結合物と、測定対象たる抗原又は抗体とを、該固定化物とを水溶液中で共存せしめて抗原と抗体の反応と酵素と酵素阻害もしくは活性化物質の反応とを競争反応させ、その後酵素活性又は酵素阻害もしくは活性化物質の活性を測定することによって抗原又は抗体を測定するのである。

ここに測定対象たる抗原あるいは抗体とは本発明法における測定対象であることはいうまでもな

く、例えば2抗体法においては測定の目的物である抗原と第1抗体との結合物が測定対象たる抗原になる。

結合物の組合せは抗原と酵素、抗原と酵素阻害もしくは活性化物質、抗体と酵素、及び抗体と酵素阻害もしくは活性化物質の4通りあるわけであるが、この結合物は前記固定化物の両固定相と反応するものでなければならぬから、この組合せは固定化物に応じて自動的に定まる。結合物の製法としては要は結合物が両方の活性を発揮しうれば足り、例えば結合させる双方がいずれも蛋白質である場合には、酵素等の活性蛋白を固定する架橋法あるいはペプチド結合法などを活用できる。結合する一方又は双方が蛋白質でない場合にはそれぞれの官能基を考慮して結合方法を適宜選択すればよい。

本発明の測定方法の原理を、抗原と酵素阻害物質を固定した固定化物と酵素と抗体の結合物を用いて抗原を測定する場合を例として説明すると、まず、測定される抗原がないときには一般に抗原

-抗体間の結合力が酵素-酵素阻害もしくは活性化物質間の結合力より強いところから、結合物は固定化抗原に結合し酵素阻害物質の固定化物には結合しない。次に、測定される抗原が存在するときには結合物の抗体が測定対象抗原と固定化抗原との間で競争反応し、測定対象抗原と結合した結合物はさらに酵素部分が固定化物の酵素阻害物質と反応してそこに結合する。そしてこの結合量だけ酵素活性が低下するから予め遊離の抗原量と酵素活性の低下量の関係を求めておけば、酵素活性の低下量を測定することによって測定対象抗原量を知ることができる。

測定方法としては、要は水溶液中において固定化物と結合物と測定対象たる抗原又は抗体の三者を共存させればよく添加順序は問わない。この共存は一方の反応中の全時間行なわれている場合に限らず、一時的であってもよい。例えば、抗原及びそれと酵素との結合物を抗体固定化チューブで反応させたのちに酵素インヒビター固定化ビーズを投入して余剰の結合物をスカベンジするような

場合も本発明に含まれる。

水溶液は抗原-抗体反応及び酵素-酵素阻害もしくは活性化物質反応が反応しやすいpHにするのがよくそのためにリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液などの緩衝液を用いるのがよい。pHは抗原及び抗体と酵素及び酵素阻害もしくは活性化物質によって異なるが通例pH5~8程度がよい。温度も抗原及び抗体と酵素及び酵素阻害もしくは活性化物質によって異なるが通例は15~45℃程度である。

反応後は固定化物又は水溶液の酵素活性又は酵素阻害もしくは活性化物質の活性を測定する。測定方法は測定対象たる酵素あるいは酵素阻害もしくは活性化物質の活性を測定する公知の方法によればよく、例えば酵素活性を測定する場合にも使用する酵素と基質の組合せにより、比色法、螢光法、フォトンカウンター等を用いた発光法など種々の測定方法を利用することができる。

本発明の測定方法は抗原、抗体の種類を問わず広く測定しうるものであり、従来の各種酵素免疫

法のうちの代表的な方法であるサンドイッチ法においては操作が煩雑であるという難点があり、ホモジニアス法においては感度が不十分であるという難点があったところを本発明の方法によって、操作を簡単にしかつ感度を高めて、両者の問題点を一挙に解決したのである。この本発明の方法は抗原又は抗体と酵素又は酵素阻害もしくは活性化物質をいずれも固定し、しかも両者の固定相を分離するという特殊な技法によって達成したものであり、この相分離によって一方の固定相に結合した抗原または抗体と酵素または酵素阻害もしくは活性化物質との結合物がさらにもう一方の固定相に結合する可能性を排除し、そのことによって反応操作が1回であるにもかかわらず高感度を達成することができたのである。

以下、実施例を示す。

#### 実施例1

##### (1) 相分離担体の調製

平均分子量500000ダルトンのデキストラン(ファーマシア社製)10gを80%エタノール

を含む0.1N NaOH 50 mlに溶解し、徐々にモノクロル酢酸ナトリウム0.6gを添加して30℃で5時間反応させてカルボキシメチル基を導入させる。反応終了後、この一部を10mMホウ酸緩衝液pH6.0に対して透析し、3N HClで24時間処理してアミノ基を遊離させたナイロン製球形ビーズ(直径6mm)100個に加え水溶性カルボジイミド(以後WSCと略す)を加えて4℃で6時間反応させてナイロンのアミノ基の一部にデキストランを導入する。上記緩衝液で2回洗浄操作を行ったビーズに、10mMホウ酸緩衝液pH5.5に溶解したβ-ガラクトシダーゼの阻害剤であるフェニルアセトアルドキシムのアミノ誘導体に無水コハク酸を反応させた化合物を1mg/mlの濃度で加え、WSCとともに30℃で18時間反応を行ってナイロンの残りのアミノ基とカップリングを行なう。このナイロン-ビーズに0.02M過ヨウ素酸ナトリウム溶液を加え4℃で30分反応させたのちにエチレンジアミンを0.04Mになるように加え室温で1時間反応させる。反応液を除去したのちに50mM

炭酸ナトリウム緩衝液pH8.5に溶解したフェリチン(10mg/ml)を加え、室温で4時間反応させる。1%水素化硼素ナトリウムを加え1晩放置後0.5%BSAを含む同緩衝液で2回洗浄のち、20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH7.5中に保存する。

##### (2) 酵素標識抗体の調製

ブタ肝臓より調製したβ-D-ガラクトシダーゼを公知のマレイミド架橋法により、抗体と結合させる。

山羊抗ヒトフェリチン抗体のIgG分画20mgを1mlの0.1M酢酸ナトリウム緩衝液pH4.5に溶解し0.4%ペプシンを加えて37℃16時間酵素消化を行う。pHを8.0に合せたのちにセファデックスG-150カラムにより0.1M硼酸ナトリウム緩衝液pH8.0で溶出し、F(ab')<sub>2</sub>を得る。これを0.1M酢酸ナトリウム緩衝液pH5.0中で20%モルの2-メルカプトエチルアミンと37℃で90分反応させ、セファデックスG-25カラムにて過剰試薬を除去する。得られたFab'を0.1M酢酸ナトリウム緩衝液pH5.0の条件下、1.0mlのN,N'

-o-フェニレンジイマレイミド飽和溶液を加え30℃で20分間反応を行ったのち、セファデックスG-25カラムにてマレイミド-Pab'を集める。これに硫酸懸濁状態の $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを20  $\mu$ l加え30℃で20分反応させ、中和したのちに0.1 Mウシ血清アルブミン(BSA) - 1 mM  $MgCl_2$  - 0.1 M  $NaCl$ を含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.0で平衡化したセファローズ6Bカラムで精製する。

### (3) フェリチン抗原の測定法

(1)で調製した相分離担体ナイロンビーズを1個試験管にとり、0.4 mlの0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.0を加える。これにフェリチン標準液または血清希釈液を50  $\mu$ l加え続いて希釈した酵素標識抗体を50  $\mu$ l加えて37℃で1時間反応させる。基質である0.005 M p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを0.5 mlそのまま加え、15分間37℃で反応したのちに、2.0 mlの0.4 Mグリシン-NaOH緩衝液(pH 10.5)で反応を止め、400 nmの吸光度を測定する。

で洗浄後 $\beta_2$ -マイクログロブリン固定化担体を得る。陰イオン交換樹脂プレートは、ラット肝より精製したアミノペプチダーゼB(10  $\mu$ g/ml)を含む50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液pH 6.0の中でWSCを加えて室温で2時間反応させ、同緩衝液で洗浄後、酵素不溶化担体を得る。

### (2) 標識担体の調製

放線菌から単離したアミノペプチダーゼBの阻害物質であるペスタチンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(0.02  $\mu$ g/ml)の0.1 M  $NaHCO_3$ 溶液に山羊抗ヒト $\beta_2$ -マイクログロブリンIgG分画10  $\mu$ gを加え室温で2時間反応した後セファデックスG-25カラムにより精製して阻害物質標識抗体を得る。

### (3) $\beta_2$ -マイクログロブリンの測定

$\beta_2$ -マイクログロブリン固定化担体を試験管にとり、阻害物質標識抗体を含む50 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.2を0.4 mlと $\beta_2$ -マイクログロブリン標準溶液又は血清検体希釈液0.1 mlを加え、37℃で1時間反応させる。これに酵素不溶化担

体のようにして測定した結果、測定すべきフェリチン量の増加に対応して阻害率が増加して、フェリチン量25~500  $\mu$ g/mlの検体の測定範囲において第1図に示すような良好な標準曲線が得られた。また血清においても上記濃度範囲において測定が可能であった。

### 実施例2

#### (1) 担体の製造

陽イオン交換樹脂(アンバーライトIRC-50)0.5 gと陰イオン交換樹脂(アンバーライトIR-45)0.6 gを各々細かくすりつぶし、別々に約1 cm<sup>2</sup>のポリスチレン基板上に均一にのせ400 kg/cm<sup>2</sup>の圧力をかけて定着させる。この陽イオン交換樹脂プレートをジオキサンにつけ、0.1 MのN-ヒドロキシスクシンイミドおよびN,N'-ジクロロヘキシルカルボジイミドを加え室温で90分間振とうを加えながら反応させる。少量のメタノールで洗浄後0.1 M  $NaHCO_3$ 溶液で希釈した $\beta_2$ -マイクログロブリン溶液を2.5 ml加えて4℃で24時間反応させ、0.05 M トリス緩衝液(pH 8.0)

体を加え37℃で30分反応させる。これに基質であるL-アルギニン- $\beta$ -ナフタルアミド溶液を0.5 ml加え37℃で30分間反応させる。その後ガーネット試薬1.0 mlを加え室温で15分間放置後525 nmの吸光度を測定する。このようにして測定した結果、その阻害の程度と、加えた抗原量について第2図に示すような良好な標準曲線が得られた。

### 実施例3

#### (1) 相分離担体の調製

小麦粉より分離した分子量約24000の蛋白性アミラーゼインヒビター20  $\mu$ gを5 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.5に溶解し、これに9  $\mu$ g/mlのS-アセチルメルカプトコハク酸無水物のジメチルスルホキシド溶液100  $\mu$ lを加えて37℃で1時間加熱した。続いて、pH 7.5の1 Mヒドロキシルアミン溶液110  $\mu$ lを加えて37℃で30分間反応させた。この反応液をセファデックスG-25のカラムに流して1 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸緩衝液pH 6.5でゲル通過し、未反応

のS-アセチルメルカプトコハク酸を除去してSH化アミラーゼインヒビターを得た。

一方、直径4mmのナイロン製球形ビーズを3N塩酸中に24時間浸してアミノ基を遊離させた。このビーズを水洗後0.1Mリン酸緩衝液pH6.3に浸し、1/10容量の2mg/mlのCHMSジオキサン溶液を加えて室温にて3時間反応させた。ビーズを取り出して0.1Mリン酸緩衝液pH6.3で2回洗浄し、これに前記のSH化アミラーゼインヒビター溶液を加えて4℃で一夜反応させた。このビーズを上記緩衝液で洗浄してから1%BSAを含む50mMリン酸緩衝液pH7.0中に4℃にて保存し、これをアミラーゼインヒビター固定化ビーズとした。

直径3.6mmのポリスチレン製球形ビーズを水洗後、20mMリン酸緩衝液pH7.5に溶解した山羊抗ヒトAFP特異IgG(OD<sub>280</sub>=0.1)に浸し、4℃で2日間物理吸着させた。これを20mMリン酸緩衝液pH7.5で十分に洗浄してから1%BSA及び0.14M塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液pH7.5中に4℃にて保存し、抗体固定化ビーズと

した。

## (2) 酵素標識抗原の調製

ブタ脾臓由来のα-アミラーゼ5mgを5mMEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH7.5に溶かし、これに9mg/mlのS-アセチルメルカプトコハク酸無水物のジメチルスルホキシド溶液100μLを加えて37℃で30分間反応させた。この反応液をセファックスG-25のカラムに流して1mMEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH6.5でゲル通過し、未反応のS-アセチルメルカプトコハク酸を除去した。こうして得られたSH化α-アミラーゼを1mlまで濃縮した。

一方、ヒト腹水由来のα-フェトプロテイン(AFP)1mgをpH6.3の0.1Mリン酸緩衝液1mlに溶かし、これに2mg/mlの4-マレイミドメチルシクロヘキサノ-1-カルボン酸サクシンイミドエステル(CHMS)のジオキサン溶液100μLを加えて室温にて1時間反応させた。この溶液をセファックスG-25カラム(1cm×40cm)に流して1mMEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH6.5

でゲル通過して未反応のCHMSを除き、4-マレイミドメチルシクロヘキサノ-1-カルボン酸とAFPとの結合物(CHM化AFP)を得た。この結合物の溶液を1mlに濃縮し、SH化α-アミラーゼを加えて4℃で一夜放置して反応させた。この反応液をセファクリルS-200(1cm×120cm)でゲル通過し、AFP-アミラーゼ結合物を得た。

## (3) AFPの測定

試験管にアミラーゼインヒビター固定化ビーズと抗体固定化ビーズ各1個を入れ、50mMトリス緩衝液-0.14MNaCl-0.2MBSA pH7.8を800μL加えた。これに800ng/μLよりの4n希釈列のAFP溶液各100μLを加え、次いで、AFP-アミラーゼ結合物を100μLずつ加えて室温で1時間半放置した。

この各試験管に酵素基質液としてオートバックα-アミラーゼ(ベーリンガー・マンハイム社製)を1mlずつ加え、10分後の波長405nmにおける吸光度を測定してAFP量とアミラーゼ活性との関係を求めた。

得られた結果を第3図に示す。

次に、各種ヒト血清の5倍希釈液100μLずつを用いて上記と同様に測定を行ない、第1図を検量線としてAFPの濃度を測定した。

一方、これと並行して従来法であるラジオイムノアッセイ(RIA)を用いて、同じヒト血清のAFP濃度を測定した。

得られた結果を下表に示す。

血清	AFP 濃 度	
	本発明法	従 来 法
A	50 ng/μL	43.2 ng/μL
B	180	195.9
C	430	404.3
D	710	750.0

## 実施例4

### (1) 相分離担体の調製

担体固相はポリスチレンを基板として、公知のポリマーブレンド法に従って作成した。ポリ-L-システイン及びポリ-L-リジン各10mgをジメチルスルホキシド-エーテル混合溶媒に溶解し、

ポリスチレンポリマー基板上に塗布して減圧下で溶媒を除去した。その際、これらの各ポリマーは吸着エネルギーが異なるため、アミノ基層とSH基層との間でマイクロ相分離が形成された。SH基含量をジチオピリドン法で、そして、アミノ基含量をニンヒドリン法でそれぞれ測定したところ、SH基とアミノ基の比率はほぼ1:1であった。このポリスチレン基板を0.8mm角に裁断して担体固相として用いた。

プロモ酢酸70mgとN-ヒドロキシサクシンイミド115mgをジオキサン4mlに溶かし、これにジクロヘキシルカルボジイミド115mgを加えて室温で90分間反応させた。生じたジクロヘキシル尿素有ろ過して除き、得られた溶液に0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7.5を加えて25mlにした。この液に上記固相を加えて4℃で60分間反応させ、0.1M NaClで洗浄してプロモアセトアミド担体を得た。この担体を0.01Mピリドキサル-5'-リン酸と0.1M DL-バリンを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH6.0に浸し、暗室

に室温で72時間放置した。続いて、0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH9.0及びpH5.5で洗浄し、pH7.0に戻して、ピリドキサル-5'-リン酸固定化担体を得た。

山羊抗ヒトIgG特異IgG( $\alpha$ -hIgG)5mgをpH6.3の0.1Mリン酸緩衝液1mlに溶解し、2mg/mlのCHMSのジオキサン溶液100 $\mu$ lを加えて室温で1時間反応させた。反応液をセファデックスG-25のカラムに流して1mM EDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH6.5でゲル透過を行ない、未反応のCHMSを除いてCHM化 $\alpha$ -hIgGを得た。このCHM化 $\alpha$ -hIgGを上記のピリドキサル-5'-リン酸固定化担体に加えて4℃で3日間反応させ、その後、5%BSAを含む0.05Mリン酸-0.14M NaCl緩衝液を加えて4℃で一夜放置し、相分離担体とした。

## (2) 酵素標識抗原の調製

ヒトIgG(hIgG)5mgを5mM EDTAを含むpH7.5の0.1Mリン酸緩衝液に溶かし、これに9mg/mlのS-アセチルメルカプトコハク酸無水物の

ジメチルスルホキシド溶液100 $\mu$ lを加えて37℃で1時間加熱した。続いて、pH7.5の1Mヒドロキシルアミン溶液110 $\mu$ lを加えて37℃で30分間放置して反応させた。この反応液をセファデックスG-25のカラムに流して1mM EDTAを含むpH6.5の0.1Mリン酸緩衝液でゲル透過して未反応のS-アセチルメルカプトコハク酸を除去し、流出液を1mlまで濃縮してSH化hIgGを得た。

一方、4mgのG6PDHをpH6.3の0.1Mリン酸緩衝液1mlに溶かし、これに2mg/mlのCHMSのジオキサン溶液100 $\mu$ lを加えて室温にて1時間放置した。この溶液をセファデックスG-25のカラムに流して1mM EDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH6.5でゲル透過して未反応のCHMSを除去した。こうして得られたCHM化G6PDHに上記のSH化hIgGを加え、4℃で一夜放置して反応させた。この反応液をセファクリルS-300カラムでゲル透過し、G6PDH結合hIgHを得た。

## (3) ヒトIgGの定量

試験管に各種濃度のヒトIgG溶液各50 $\mu$ lを入れ、上記の酵素標識抗原溶液450 $\mu$ lを加え、前記の相分離担体をさらに加えて室温で1時間反応させた。続いて、0.01%水素化ホウ素ナトリウム水溶液を各50 $\mu$ lづつ加え、室温で20分間反応させた。相分離担体を取り出し、生理食塩水で洗浄後別の試験管に移して、G6PDHの基質液として0.1Mグリニルグリシン緩衝液pH8.5、2.0mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM G6P及び0.5mM NADPを含む溶液1.0mlを加えた。10分後の波長340nmにおける吸光度を測定したところ、第4図に示すような結果が得られた。

## 実施例5

### (1) 相分離担体の調製

ブタ脾臓由来の $\alpha$ -マミラーゼと山羊抗ヒトIgE特異IgG( $\alpha$ -IgE)を各43.0mMクエン酸ナトリウム-0.3M NaCl緩衝液pH7.0にOD<sub>280</sub>=0.4になるように溶解した。この各溶液を浸した各伊紙をいずれもニトロセルロースメンブランフィルター(東洋伊紙(株)製、15×15cm)に



重ねて4℃で2日間放置し、 $\alpha$ -アミラーゼと $\alpha$ -IgEを別々にメンブランフィルターに吸着させた。この各メンブランフィルターを5% BSA及び0.14 M NaClを含む0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.5 溶液に浸し、4℃で一晩放置後、0.14 M NaClを含む50 mM リン酸緩衝液 pH 7.5 で洗浄し、4℃で真空乾燥した。各メンブランフィルターを0.5×0.75 cmの大きさに裁断し、この二重のフィルターを吸着面を表にして0.5×5×0.05 cmのトリアセテートフィルム基板の端の両面にビニル系接着剤で接合し、相分離担体スティックとして使用した。

## (2) 阻害剤標識抗原の調製

ミエローマ患者血清から精製したヒトIgEを実施例3のAFPと同様にしてCHM化し、これに実施例3と同様にして調整したSH化アミラーゼインヒビターを加えてIgE-アミラーゼインヒビター結合物を生成させた。この反応液をセファクリルS-300カラム(2×100 cm)でゲル濾過して上記結合物の分画を得た。

## (3) IgEの測定

試験管に各種濃度のヒトIgE溶液各50  $\mu$ Lをとり、上記IgE-アミラーゼインヒビター結合物の50 mM リン酸緩衝液-0.14 M NaCl-2% BSA溶液450  $\mu$ Lを加え、次いで、相分離担体スティックを加えて室温で1時間反応させた。別の試験管に酵素基質液としてオートパック $\alpha$ -アミラーゼ(パーリンガー・マンハイム社製)を各1 ml分注し、反応後の相分離担体スティックとこの試験管に移して反応させ、10分後の波長405 nmにおける吸光度を測定してIgE量とアミラーゼ活性との関係を求めた。

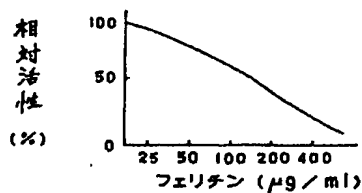
得られた結果を第5図に示す。

## 4 図面の簡単な説明

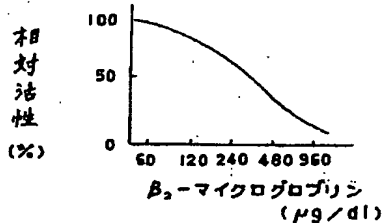
第1図〜第5図はいずれも本発明の方法で測定して得られた各種抗原あるいは抗体の濃度と酵素活性との関係を示すものである。

特許出願人 富士レボロ株式会社  
代理人 弁理士 田 中 政 浩

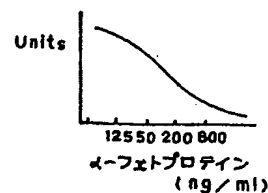
第 1 図



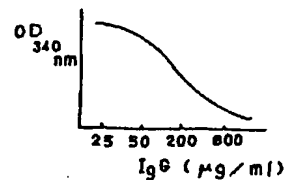
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第 5 図

